

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Michael BUCHHOLZ

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: SULFUR-CONTAINING ANIMAL-FEED ADDITIVES

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
Application No. Date Filed
60/404,126 August 19, 2002
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

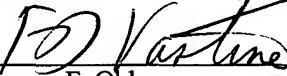
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Germany	102 37 479.1	August 16, 2002

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
 are submitted herewith
 will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon

Registration No. 24,618



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

Frederick D. Vastine, Ph.D.
Registration No. 27,013

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 37 479.1
Anmeldetag: 16. August 2002
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Schwefel-haltiges Tierfuttermitteladditiv
IPC: A 23 K, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Hans-Joachim Hoß", is written over a stylized, horizontal, swoosh-like flourish.

Hoß

05.06.00



Schwefel-haltiges Tierfuttermitteladditiv

Die Erfindung betrifft Schwefel-haltige Tierfuttermitteladditive hergestellt aus Fermentationsbrühen.

5 Stand der Technik

L-Cystein und seine Derivate werden im Pharmabereich, in der Kosmetik und in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Für diese Anwendungen, wird L-Cystein typisch in reiner Form hergestellt.

10 Traditionell wird L-Cystein durch Extraktion aus keratinhaltigen Materialien wie beispielsweise Haaren, Borsten und Federn oder durch enzymatische Umsetzung von Vorstufen gewonnen.

Seit einigen Jahren wird L-Cystein auch mit L-Cystein
15 überproduzierenden Mikroorganismen fermentativ hergestellt. WO 97/15673, EP-A-0885962 und WO 01/27307 und beschreiben Verfahren zur Herstellung von O-Acetylserin, L-Cystein oder L-Cystein-Derivaten und verwandte Produkte unter Verwendung von E. coli Mikroorganismen.

20 WO 97/15673 betrifft ein Verfahren zur Herstellung von O-Acetylserin, L-Cystein und davon abgeleiteten schwefelhaltigen Verbindungen unter Verwendung feed back resistenter Serin-Acetyltransferasen. Diese Serin-Acetyltransferasen haben eine im Vergleich zum Wildtyp-
25 Enzym reduzierte Sensitivität gegenüber dem Inhibitor L-Cystein.

EP-A-0885962 beschreibt Mikroorganismen die mindestens ein überexprimierte Gen kodierend für ein Protein, welches direkt zur Ausschleusung von Antibiotika oder anderen für den Mikroorganismus toxischen Stoffen aus der Zelle enthalten, und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Cystein, L-Cystin, N-Acetyl-Serin oder

Thiazolidinderivaten unter Verwendung dieser Mikroorganismen.

WO 01/27307 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von L-Cystein oder L-Cystein-Derivaten mittels Fermentation von

5 Mikroorganismen, sowie für das Verfahren geeignete Mikroorganismen. Diese Mikroorganismen besitzen eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsregulators CysB, wobei die CysB-Aktivität ein für ein Wildtyp-CysB typisches Regulationsmuster besitzt.

10 L-Cystein nimmt eine Schlüsselposition im Schwefelmetabolismus ein und wird in der Synthese von Proteinen, Glutathion, Biotin, Methionin und anderen schwefelhaltigen Metaboliten verwendet. Jedoch ist es auch bekannt, dass L-Cystein reduzierende Eigenschaften hat und 15 somit verschiedene Probleme in der Handhabung aufweist, wie zum Beispiel Stabilität.

Aufgabe der Erfindung

Daher ist es Aufgabe der Erfindung, neue Schwefel-haltige Tierfuttermitteladditive zur Verfügung zu stellen. Außerdem 20 ist es Aufgabe dieser Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung solcher Schwefel-haltigen Tierfuttermitteladditive bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung sind Tierfuttermittel-Additive auf 25 Fermentationsbrühe-Basis, dadurch gekennzeichnet, dass sie

- a) eine oder mehrere der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidine einschließlich deren Salze, und
- b) 2 - 100% der weiteren nicht-zellulären Inhaltsstoffe der Fermentationsbrühe enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive.

Unter Cystein-Verbindungen versteht man L-Cystein, das

- 5 Dimer L-Cystin und Thiazolidine einschließlich ihrer Salze. Der Gehalt an Cystein-Verbindungen in den erfindungsgemäßen Futtermittel-Additiven liegt bei 1 - 98 Gew.-% (Gewichtsprozent).

Unter Thiazolidinen und den entsprechenden Hemithioketalen

- 10 versteht man die Reaktionsprodukte von L-Cystein mit Verbindungen, die eine Carbonyl-Gruppe enthalten, das heißt Ketonen und Aldehyden wie beispielsweise Brenztraubensäure (Pyruvat) und Glyoxylsäure (Glyoxylat). Bei Kondensation von L-Cystein mit Brenztraubensäure entsteht Methyl-
15 thiazolidin-2,4-dicarbonsäure und bei Kondensation mit Glyoxylsäure Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure beziehungsweise das entsprechende Hemithioketal. Zu den Thiazolidinen gehören unter anderen weiterhin 2-Carboxymethyl-thiazolidin-2,4-dicarbonsäure und 2-Carboxyethyl-
20 thiazolidin-2,4-dicarbonsäure beziehungsweise das entsprechende Hemithioketal.

Die Cystein Verbindungen liegen gegebenenfalls in Form ihrer Salze vor, wobei es sich bei den Salzen der Cystein-Verbindungen um eines oder mehrere der Salze, ausgewählt

- 25 aus der Gruppe der Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalze handelt.

Unter einer Fermentationsbrühe versteht man ein

Fermentationsmedium, in dem ein Mikroorganismus für eine gewisse Zeit und bei einer gewissen Temperatur kultiviert

- 30 wurde. Das Fermentationsmedium beziehungsweise Kulturmedium enthält sämtliche Substanzen beziehungsweise Komponenten, die eine Vermehrung des Mikroorganismus und eine Bildung der gewünschten chemischen Verbindungen, im Falle der vorliegenden Erfindung eine oder mehrere der Verbindungen

ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidine, sicherstellt.

Bei Abschluss der Fermentation enthält die entstandene Fermentationsbrühe die infolge der Vermehrung der Zellen des Mikroorganismus entstandene Biomasse des Mikroorganismus, die im Laufe der Fermentation gebildeten chemischen Verbindungen und die nicht verbrauchten Bestandteile des eingesetzten Fermentationsmediums beziehungsweise der eingesetzten Fermentationsmedien. Zu den gebildeten chemischen Verbindungen gehören die direkt erwünschten Produkte, im Falle der vorliegenden Erfindung eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidine und die Nebenprodukte. Die Nebenprodukte sind gegebenenfalls auch erwünscht.

Unter „weiteren nicht-zellulären Inhaltsstoffen der Fermentationsbrühe“ versteht man sämtliche Bestandteile der Fermentationsbrühe abzüglich der Biomasse und abzüglich der erwünschten Produkte, im Falle der vorliegenden Erfindung eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidine.

Die weiteren nicht-zellulären Inhaltsstoffen der Fermentationsbrühe verbleiben je nach Anforderung zu 2% - 100%, 3% - 100%, 4% - 100%, 5% - 100%, 10% - 100%, 20% - 100%, 30% - 100%, 40% - 100%, 50% - 100%, 60% - 100%, 70% - 100%, 80% - 100%, oder 90% - 100%, bevorzugt zu größer gleich (\geq) 50%, \geq 60%, \geq 70%, \geq 80%, \geq 90% oder \geq 95% in den erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additiven. Sie können gegebenenfalls auch vollständig (100%) enthalten sein.

Zu den weiteren nicht-zellulären Inhaltsstoffen der Fermentationsbrühe gehören ein oder mehrere der Nebenprodukte, die bei der Fermentation von L-Cystein bildenden Mikroorganismen zusätzlich zu einer oder mehrerer der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-

Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen erzeugt beziehungsweise generiert werden. Zu diesen Nebenprodukten gehören, zum Beispiel Zucker, wie Trehalose.

Zu diesen Nebenprodukten gehören außerdem organische
5 Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie zum Beispiel Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure oder Fumarsäure.

Zu diesen Nebenprodukten gehören auch L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-
10 Alanin, L-Tryptophan, L-Serin, Glycin und die Schwefel-haltige Aminosäure L-Methionin. Dazu zählen auch Aminosäurederivate aus der Gruppe der N- und O-acetylierten Aminosäuren, beispielsweise N-Acetyl-Serin und O-Acetyl-Serin.

15 Weiterhin gehören zu diesen Nebenprodukten Vitamine ausgewählt aus der Gruppe das Schwefel-haltige Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B5 (Pantothensäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cyanocobalamin), das Schwefel-haltige Vitamin H (Biotin),
20 Vitamin H (Tocopherol) und Nicotinsäure beziehungsweise Nicotinsäureamid.

Zu diesen Nebenprodukten gehören ebenfalls Schwefel-haltige Stoffwechselprodukte wie beispielsweise Glutathion, Cystathionin, Liponsäure und Coenzym A.

25 Zu den weiteren nicht-zellulären Inhaltsstoffen der Fermentationsbrühe gehören auch Reste der anorganischen und organischen Komponenten der eingesetzten Fermentationsmedien.

Bei den anorganischen Komponenten handelt es sich
30 beispielsweise um Calcium und Magnesium in Form ihrer Kationen, Phosphor in Form von Phosphat und Schwefel in Form von Sulfat.

Bei den organischen Komponenten handelt es sich beispielsweise um Zucker wie beispielsweise Glucose, Fruktose oder Isomaltose, Vitamine wie beispielsweise Biotin oder Thiamin und organische Säuren wie

5 beispielsweise Zitronensäure (Citrat). Bei den genannten Komponenten des Fermentationsmediums kann es sich auch um Bestandteile aus komplexen Stoffgemischen wie Extrakten beispielsweise Hefeextrakt, Peptone und Hydrolysate, oder aus anderen Zusätzen wie Maisquellwasser (Corn Steep

10 Liquor, CSL) oder Melasse handeln.

Die chemischen Verbindungen, die die weiteren nicht-zellulären Inhaltsstoffen der Fermentationsbrühe ausmachen, sind gegebenenfalls erwünscht, wenn sie die nutritive Wirksamkeit des Tierfuttermittel-Additivs verbessern.

15 Gegebenfalls werden die genannten chemischen Verbindungen und auch andere Verbindungen, die sich günstig für die Darstellung der erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive auswirken, wie beispielsweise Ascorbinsäure (Vitamin C), Tocopherol (Vitamin E), Sojaöl oder Ameisensäure

20 beziehungsweise deren Salze, während des Aufarbeitungsprozesses oder während der Fermentation hinzugefügt.

Gegebenenfalls werden je nach Anforderung eine oder mehrere der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidine oder Zubereitungen beziehungsweise Gemische, die diese enthalten, während des Aufarbeitungsprozesses oder gegen beziehungsweise am Ende der Fermentation hinzugefügt, um den gewünschten Gehalt im Tierfuttermittel-Additiv zu erzielen.

30 Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung ist ein Tierfuttermittel-Additiv welches die während der Fermentation gebildete Biomasse des Mikroorganismus zu >0% - 100% enthält.

In diesem Sinne kann man die erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive in zwei Gruppen einteilen: a) die die höchstens die Hälfte ($\leq 50\%$), oder weniger als die Hälfte oder auch nur geringfügige Reste der gebildeten Biomasse enthalten und b) die die den überwiegenden ($>50\%$) oder den gesamten Anteil der gebildeten Biomasse enthalten.

- Die erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive der Gruppe a) können mehr als ($>$) $>0\% - \leq 50\%$, $>0\% - \leq 40\%$, $>0\% - \leq 30\%$, $>0\% - \leq 20\%$, $>0\% - \leq 10\%$, $>0\% - \leq 5\%$, $>0\% - \leq 1\%$ oder $>0\% - \leq 0,1\%$ der gebildeten Biomasse enthalten.

Die erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive der Gruppe b) können $>50\% - 100\%$, $>60\% - 100\%$, $>70\% - 100\%$, $>80\% - 100\%$, $>90\% - 100\%$ oder $>95\% - 100\%$ der gebildeten Biomasse enthalten.

- 15 Die Biomasse liegt bevorzugt in inaktivierter, das heißt nicht vermehrungsfähiger Form vor. Wird die Biomasse teilweise oder vollständig im Tierfuttermittel-Additiv belassen, so enthält dieses als zusätzliche nutritiv wirksame Komponente die Proteine und die weiteren
20 Bestandteile des Mikroorganismus.

Die erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive können in flüssiger oder fester Form vorliegen.

- Der Gehalte an Cystein-Verbindungen in den flüssigen Formen betragen im Allgemeinen 1 - 35 Gew.-%, 2 - 35 Gew.-%, 4 -
25 35 Gew.-%, 6 - 35 Gew.-%, 8 - 35 Gew.-% oder 10 - 35 Gew.-%. Sie können gelöst oder suspendiert vorliegen. Die Gesamtrockenmasse in den flüssigen Formen des Tierfuttermittel-Additivs beträgt im Allgemeinen 5 - 60 Gew.-%.

- 30 Unter Gesamtrockenmasse versteht man den Anteil sämtlicher gelöster und suspendierter Stoffe, die nach Entzug von Wasser aus der zu untersuchenden Probe (Entfernung von Wasser durch Trocknung bis zur Gewichtskonstanz) verbleibt.

Der Gehalt an Cystein-Verbindungen in den festen Formen der Tierfuttermittel-Additive beträgt im Allgemeinen 1 - 98 Gew.-%, 2 - 98 Gew.-%, 4 - 98 Gew.-%, 6 - 98 Gew.-%, 8 - 98 Gew.-%, 10 - 98 Gew.-%, 15 - 98 Gew.-% oder 20 - 98 Gew.-%

5 bezogen auf die Gesamtrohmasse der Tierfuttermittel-Additive. Gehalte von 1 - 90 Gew.-%, 2 - 90 Gew.-%, 4 - 90 Gew.-%, 6 - 90 Gew.-%, 8 - 90 Gew.-%, 10 - 90 Gew.-%, 15 - 90 Gew.-% oder 20 - 90 Gew.-% oder Gehalte von 1 - 80 Gew.-%, 2 - 80 Gew.-%, 4 - 80 Gew.-%, 6 - 80 Gew.-%, 8 - 80

10 Gehalte von 1 - 60 Gew.-%, 2 - 60 Gew.-%, 4 - 60 Gew.-%, 6 - 60 Gew.-%, 8 - 60 Gew.-%, 10 - 60 Gew.-%, 15 - 60 Gew.-% oder 20 - 60 Gew.-% oder Gehalte von 1 - 40 Gew.-%, 2 - 40 Gew.-%, 4 - 40 Gew.-%, 6 - 40 Gew.-%, 8 - 40 Gew.-%

15 oder 10 - 40 Gew.-% sind gleichfalls möglich.

Der Wassergehalt der festen Formen beträgt üblicherweise bis zu 5 Gew.-%, bevorzugt bis zu 4 Gew.-%, und besonders bevorzugt weniger als 2 Gew.-%.

Die festen Formen liegen je nach Anforderung als

20 sprühgetrocknete oder lyophilisierte, feinteilige, rieselfähige Pulver oder auch in granulierter beziehungsweise grobkörniger, weitgehend staubfreier, in jedem Fall aber in rieselfähiger Form vor.

Mit dem Begriff „rieselfähig“ sind Pulver gemeint, die aus einer Serie von Glasauslaufgefäß mit verschieden großen Auslauföffnungen mindestens aus dem Gefäß mit der Öffnung 5 mm (Millimeter) ungehindert auslaufen (Klein, Seifen - Öle - Fette - Wachse 94 (24), 849-858 (1968)).

Mit dem Begriff „feinteilig“ ist ein Pulver mit

30 überwiegendem Anteil (> 50%) einer Korngröße von 20 bis 200 µm Durchmesser gemeint.

Mit dem Begriff „grobkörnig“ sind Produkte mit überwiegendem Anteil (> 50%) einer Korngröße von 200 bis 2000 µm Durchmesser gemeint.

- Der Begriff „staubfrei“ bedeutet, dass das Produkt
5 lediglich geringe Anteile (< 5%) an Körngrößen unter 20 µm Durchmesser enthält.

Methoden zur Korngrößenbestimmung sind beispielsweise im Lehrbuch zur „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“ von R. H. Müller und R. Schuhmann (Wissenschaftliche

- 10 Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996)) oder im Lehrbuch „Introduction to Particle Technology“ von M. Rhodes (Verlag Wiley & Sons (1998)) beschrieben.

Die festen Formen der erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive können auch einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Getreidemehle, Mehle, Stärken, Zucker oder andere oder übliche Verdickungs- oder Bindemitteln enthalten.

- 20 Sie können weiterhin Filmbildnern wie beispielsweise Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate, Stearate, Stärken, Gummis und Celluloseether enthalten, welche die Produkte in einen Zustand bringen, in dem sie stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen sind.

- 25 Zur Herstellung von Cystein-Verbindungen haltigen Fermentationsbrühen können Gram-negative Bakterien, Gram-positive Bakterien, Hefen oder Pilze verwendet werden, die die Fähigkeit besitzen L-Cystein in einem geeigneten Fermentationsmedium intrazellulär oder extrazellulär zu bilden.

Unter den Gram-negativen Bakterien ist insbesondere Escherichia coli zu nennen. L-Cystein-Produzenten von

Escherichia coli sind beispielsweise die in der WO 97/15673 beschriebenen Stämme

JM15 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEIV,
JM15 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEV,
5 JM15 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEX,
JM15 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEXI,
JM15 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEXII,
JM15 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEXIV,
JM15 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEXV,
10 JM15 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEXVI,
JM15 transformiert mit dem Plasmid
pACYC184/cysEXXIII, und
JM15 transformiert mit dem Plasmid
pACYC184/cysEDel1255

15 Weitere L-Cystein-Produzenten von Escherichia coli sind beispielsweise die in der EP-A-0885962 beschrieben Stämme

W3110 transformiert mit dem Plasmid 100-1-1,
W3110 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cySEIV,
W3110 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cySEIV-
20 mar,
W3110 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cySEIV-GAPDH-ORF306,
W3110 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEX,
W3110 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEX-
25 mar, und
W3110 transformiert mit dem Plasmid pACYC184/cysEX-GAPDH-ORF306.

In der WO 01/27307 sind folgende L-Cystein produzierende Stämme von Escherichia coli beschrieben:

30 W3110 transformiert mit dem Plasmid pHC30, und
W3110 transformiert mit dem Plasmid pHC34.

Bei Nakamori et al. (Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64, 1607-1611) sind folgende L-Cystein produzierende Stämme von Escherichia coli beschrieben:

5 Escherichia coli JM39-8 pCEM256A,
 Escherichia coli JM39-8 pCEM256E,
 Escherichia coli JM39-8 pCEM256Stop,
 Escherichia coli JM39-8 pCEM256S, und
 Escherichia coli JM39 pCEM256D.

10 Bei Takagi et al. (FEBS Letters, 1999, 452, 323-327) sind
 folgende L-Cystein produzierende Stämme von Escherichia
 coli beschrieben:

 Escherichia coli W3110 pACYC184-LH, und
 Escherichia coli MC4100 pKP291

15 Bei Daßler et al. (Molecular Microbiology, 2000, 36, 1101-
 1112) ist folgender L-Cystein produzierender Stamm von
 Escherichia coli beschrieben:

 W3110 transformiert mit dem Plasmid pKP291.

20 Die von Mino et al. (Bioscience, Biotechnology and
 Biochemistry, 1999, 63, 168-179) beschriebenen Stämme von
 Escherichia coli können ebenfalls genutzt werden.

 Unter den Gram-positiven Bakterien ist beispielsweise
 Corynebacterium glutamicum zu nennen. L-Cystein-Produzenten
 von Corynebacterium glutamicum sind unter anderem, die in
 der WO 97/15673 beschriebenen Stämme:

25 ATCC21851 transformiert mit dem Plasmid
 pWST1-cysEIV,
 ATCC21851 transformiert mit dem Plasmid pWST1-cysEX,
 ATCC21851 transformiert mit dem Plasmid
 pWST1-cysEXI, und
30 ATCC21851 transformiert mit dem Plasmid
 pWST1-cysEXIV.

Gegebenenfalls können auch Mikroorganismen verwendet werden, die eine chemischen Vorstufe zu L-Cystein und/oder L-Cystin umsetzen.

So beschreiben Yamamoto et al. (Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 5 2000, 74(8), 891-895) die enzymatische Umsetzung von DL-2-Thiazolidin-4-Carboxylsäuren zu L-Cystin mit

Pseudomonas desmolytica AJ-11071.

So beschreiben Toshikazu et al. (US-A-6,214,590) die Umsetzung von 2-Aminothiazolidin-4-carboxylsäure zu L-10 Cystein und L-Cystin mit

Pseudomonas ovalis BS.

Die L-Cystein produzierenden Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder 15 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Herstellung von Fermentationsbrühen kultiviert werden, welche eine oder mehrere der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidine enthalten.

20 Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, 25 Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for 30 General Bacteriology“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle beziehungsweise Substrate können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärkehydrolysat, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel 5 Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure und Milchsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln 10 oder als Mischung verwendet werden.

Vorteilhaft ist es, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer substratlimitiert insbesondere zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während 15 dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Substrat insbesondere Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff- haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, 20 Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

25 Als Schwefelquelle können organische und anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfide, Sulfite, Dithionit, Thiosulfate und Sulfate verwendet werden. Die Schwefelquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden

30 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder

Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.

Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies

- 5 geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen

- 10 wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Der pH-Wert liegt im allgemeinen zwischen pH 6,0 und pH 8,0 vorzugsweise zwischen pH 6,5 und pH 7,5. Zur 15 Kontrolle der Schaumentwicklung können gegebenenfalls Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können gegebenenfalls dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe hinzugefügt werden. Um aerobe 20 Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich 25 ein Maximum an Cystein-Verbindungen gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die so erhaltenen Fermentationsbrühen enthalten die Cystein-Verbindungen, das heißt eine oder mehrere der

- 30 Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidine, die Biomasse des eingesetzten Mikroorganismus und die weiteren nicht-zellulären Inhaltsstoffe der Fermentationsbrühe beziehungsweise Nebenprodukte.

Die Fermentationsbrühen haben üblicherweise einen Gehalt an Gesamtrockenmasse von 5 bis 25 Gew.-%. Der Gehalt der Cystein-Verbindungen beträgt im Allgemeinen 0,5 bis 10 Gew.-% oder 1 bis 10 Gew.-%. Höhere Gehalte sind ebenfalls möglich. Der Gehalt an Biomasse (ausgedrückt als Trockenmasse) liegt im Allgemeinen bei 1 bis 5 Gew.-%.

Zur Herstellung einer biomassefreien, flüssigen Form des erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additivs wird die Biomasse vollständig (100%) durch Separationsmethoden wie beispielsweise der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren, der Flockung oder einer Kombination hieraus aus der erhaltenen Fermentationsbrühe entfernt. Derartige Separationsmethoden sind im Stand der Technik bekannt und beispielsweise im Lehrbuch von Belter et al.

(Bioseparations, Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley and Sons, Inc., 1988) oder bei Cooper (Ultrafiltration Membranes and Applications, Polymer Science and Technology Volume 13, Plenum Press, 1980) beschrieben. Gegebenenfalls wird die erhaltene biomassefreie Brühe anschließend mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Futtermittel-Additiven, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) aus Cystein-Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen einschließlich deren Salze, enthaltenden Fermentationsbrühen die Biomasse vollständig (100%) abtrennt, und
- b) gegebenenfalls das so erhaltene Gemisch durch Entfernen von Wasser aufkonzentriert.

Zur Herstellung einer weiteren, nämlich biomassearmen, flüssigen Form des erfindungsgemäßen Tierfuttermittels Additivs wird die Biomasse nahezu vollständig oder zumindest zum überwiegenden Teil ($\geq 50\%$ bis $< 100\%$) durch

5 Separationsmethoden wie beispielsweise der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren, der Flockung oder einer Kombination hieraus aus der erhaltenen Fermentationsbrühe entfernt. Gegebenenfalls wird die erhaltene, biomassearme Brühe anschließend mit bekannten Methoden wie

10 beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert.

Diese biomassearmen Varianten der flüssigen Formen der

15 erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive enthalten $>0\% - \leq 50\%$, $>0\% - \leq 40\%$, $>0\% - \leq 30\%$, $>0\% - \leq 20\%$, $>0\% - \leq 10\%$, $>0\% - \leq 5\%$, $>0\% - \leq 1\%$ oder $>0\% - \leq 0,1\%$ der während der Fermentation gebildeten Biomasse.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur

20 Herstellung von Futtermittel-Additiven, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) aus Cystein-Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen einschließlich deren Salze, enthaltenden Fermentationsbrühen die Biomasse nahezu vollständig oder zumindest den überwiegenden Teil ($\geq 50\%$ bis $< 100\%$) abtrennt, und
- 25 b) gegebenenfalls das so erhaltene Gemisch durch Entfernen von Wasser aufkonzentriert.
- 30 Zur Herstellung einer weiteren, nämlich biomassereichen, flüssigen Form des erfindungsgemäßen Tierfuttermittels Additivs wird die Biomasse vollständig oder zumindest zum überwiegenden Teil ($> 50\%$ bis 100%) in der

Fermentationsbrühe belassen. Je nach Anforderung wird höchstens ein geringer Teil der Biomasse durch Separationsmethoden wie beispielsweise der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren, der Flockung oder einer 5 Kombination hieraus aus der erhaltenen Fermentationsbrühe entfernt.

Gegebenfalls wird die erhaltene Brühe anschließend mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, 10 Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert. Diese biomassereichen Varianten der flüssigen Formen der erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive enthalten >50% - 100%, >60% - 100%, >70% - 100%, >80% - 100%, >90% - 100% 15 oder >95% - 100% der während der Fermentation gebildeten Biomasse.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Futtermittel-Additiven, dadurch gekennzeichnet, dass man

- 20 a) in Cystein-Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen einschließlich deren Salze, enthaltenden Fermentationsbrühen die Biomasse vollständig oder zum größten Teil (100% bis > 50%) beläßt, und
- 25 b) gegebenenfalls das so erhaltene Gemisch durch Entfernen von Wasser aufkonzentriert.

Durch zusätzliche Verfahrensschritte kann der Anteil der einzelnen Komponenten der Cystein-Verbindungen, das heißt der Anteil an L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen in den 30 erfindungsgemäßen flüssigen Formen der Tierfuttermittel-Additiv gesteuert werden.

Ist ein hoher Anteil an L-Cystin erwünscht, so wird ein Oxidationsmittel beispielsweise Sauerstoff (O_2) oder

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) der Fermentationsbrühe zugefügt oder während eines Aufarbeitungsschrittes hinzugesetzt. Ist ein hoher Gehalt an L-Cystein erwünscht, so wird durch elektrochemische Verfahren wie sie im Stand der Technik 5 beispielsweise bei Ralph et al. (Journal of Electroanalytical Chemistry 375(1-2), 1-5 (1994) und 375(1-2) 17-27 (1994)) und in der EP-A-0235908 beschrieben sind, L-Cystin zu L-Cystein reduziert.

Das gebildete oder vorhandene L-Cystein kann durch Zusatz 10 von Reduktionsmitteln wie beispielsweise Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin E (Tocopherol) oder Ameisensäure beziehungsweise deren Salze stabilisiert werden. Zur Stabilisierung des L-Cysteins werden einzelne Arbeitsschritte gegebenenfalls unter Luftabschluss oder 15 unter einer Schutzgasatmosphäre, beispielsweise Stickstoff (N_2), durchgeführt. Zur Verbesserung der Löslichkeit des L-Cystins kann mit einer Säure, beispielsweise einer Mineralsäure wie Schwefelsäure (H_2SO_4) angesäuert werden. Die Auswahl der Reduktions- beziehungsweise 20 Oxidationsmittel und weiteren Hilfsstoffe erfolgt so, dass diese für die Zubereitung und Verwendung von Futtermittel-Additiven unbedenklich sind.

Gegebenfalls wird eine oder mehrere der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin 25 und Thiazolidinen als Reinsubstanz oder Konzentrat oder in Form von Zubereitungen beziehungsweise Mischungen, die diese enthalten, hinzugefügt, wobei die zugesetzte Menge an Cystein-Verbindung so zu bemessen ist, dass deren Gesamtkonzentration gegebenenfalls einschließlich ihrer 30 Salze im Tierfuttermittel-Additiv im Bereich von 1 - 98 Gew.-% liegt.

Die erfindungsgemäßen, flüssigen Tierfuttermittel-Additiv können mindestens 2 Monate gelagert werden ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an Cystein-Verbindungen 35 eintritt.

Zur Herstellung der festen Formen der erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive wird den beschriebenen flüssigen Formen weiterhin Wasser entzogen. Je nach Anforderung wird hierbei von den biomassefreien oder biomassearmen oder 5 biomassereichen Varianten der flüssigen Formen ausgegangen, die in diesem Sinn eine Vorstufe zur Herstellung der festen Formen der erfindungsgemäßen Tierfuttermittel-Additive darstellen.

Die biomassefreie oder biomassearme oder biomassereiche 10 Fermentationsbrühe wird mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert. Diese aufkonzentrierte Brühe 15 wird anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet. Derartige Methoden sind beispielsweise im Lehrbuch von Blanch und Clark 20 (Biochemical Engineering, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1997) beschrieben.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Futtermittel-Additiven, dadurch gekennzeichnet, dass man aus einer eingedickten, 25 biomassefreien oder biomassearmen oder biomassereichen Fermentationsbrühe ein Cystein-Verbindungen haltiges Futtermitteladditiv durch (c) eine oder mehrere der Maßnahmen ausgewählt aus der Gruppe Trocknen, Sprühtrocknen, Sprühgranulieren und Granulieren herstellt. 30 Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Vorteilhaft bei der Granulation oder Kompaktierung ist der Einsatz von üblichen 35 organischen oder anorganischen Hilfsstoffen,

beziehungsweise Trägern wie Stärke, Gelatine, Cellulosederivaten oder ähnlichen Stoffen, wie sie üblicherweise in der Lebensmittel- oder Futterverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung
5 finden, oder von weiteren Stoffen wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikaten oder Stearaten.

Der Begriff „lagerbar“ bedeutet, dass das erfindungsgemäße Tierfuttermittel-Additiv mindestens 2 Monate gelagert werden kann, ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an
10 Cystein-Verbindungen eintritt.

Weiterhin kann das Produkt auch auf einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Mehle, Stärken
15 Zucker oder andere aufgezogen und/oder mit üblichen Verdickungs- oder Bindemitteln vermischt und stabilisiert werden. Anwendungsbeispiele und Verfahren hierzu sind im Stand der Technik beispielsweise bei Heidenreich und Löwe (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (49), 817 - 820, (1995))
20 beschrieben.

Schließlich kann das Produkt durch Beschichtungsverfahren („Coating“) mit Filmbildnern wie beispielsweise Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate, Stearate, Stärken, Gummis und Celluloseether, wie in der
25 DE-C-4100920 beschrieben, in einen Zustand gebracht werden, in dem es stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen ist.

Durch zusätzliche Verfahrensschritte kann der Anteil der einzelnen Komponenten der Cystein-Verbindungen, das heißt der Anteil an L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen in den erfindungsgemäßen festen Formen der Tierfuttermittel-Additive gesteuert werden.
30

Ist ein hoher Anteil an L-Cystin erwünscht, so wird ein Oxidationsmittel beispielsweise Sauerstoff (O_2) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) der Fermentationsbrühe zugefügt oder während eines Aufarbeitungsschrittes hinzugesetzt. Ist

5 ein hoher Gehalt an L-Cystein erwünscht, so wird durch elektrochemische Verfahren wie sie im Stand der Technik beschrieben sind, L-Cystin zu L-Cystein reduziert. Das gebildete oder vorhandene L-Cystein kann durch Zusatz von Reduktionsmitteln wie beispielsweise Vitamin C

10 (Ascorbinsäure), Vitamin E (Tocopherol) oder Ameisensäure beziehungsweise deren Salze stabilisiert werden. Zur Stabilisierung des L-Cysteins werden einzelne Arbeitsschritte gegebenenfalls unter Luftabschluss oder unter einer Schutzgasatmosphäre beispielsweise Stickstoff

15 (N_2), durchgeführt. Zur Verbesserung der Löslichkeit des L-Cystins kann mit einer Säure, beispielsweise einer Mineralsäure wie Schwefelsäure (H_2SO_4) angesäuert werden. Die Auswahl der Reduktions- beziehungsweise Oxidationsmittel und weiteren Hilfsstoffe erfolgt so, dass

20 diese für die Zubereitung und Verwendung von Futtermittel-Additiven unbedenklich sind.

Gegebenfalls wird eine oder mehrere der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen als Reinsubstanz oder Konzentrat oder in

25 Form von Zubereitungen beziehungsweise Mischungen, die diese enthalten, hinzugefügt, wobei die zugesetzte Menge an Cystein-Verbindung so zu bemessen ist, dass deren Gesamtkonzentration gegebenenfalls einschließlich ihrer Salze im Tierfuttermittel-Additiv im Bereich von 1 - 98

30 Gew.-% liegt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist, dass man zusätzlich noch einen oder mehrere der folgenden Schritte durchführt:

- (i) Elektrochemische Reduktion (Elektrolyse) des L-Cystins zu L-Cystein in einem oder mehreren der oben genannten Schritte a) und b);
- 5 (ii) Ansäuerung mit einer konzentrierten Mineralsäure in einem oder mehreren der oben genannten Schritte a) und b;
- (iii) Zusatz eines Reduktionsmittels zu einem oder mehreren der oben genannten Schritte a), b), und c);
- 10 (iv) Verwendung eines Schutzgases in einem oder mehreren der oben genannten Schritte a), b) und c);
- (v) Zusatz eines Oxidationsmittels zu einem oder mehreren der oben genannten Schritte a), b) und c);
- 15 (vi) Zusatz von einer oder mehrerer der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen zu einem oder mehreren der oben genannten Schritte a), b) und c), wobei die zugesetzte Menge an Cystein-Verbindung so bemessen ist, dass deren Gesamtkonzentration gegebenenfalls einschließlich ihrer Salze im Tierfuttermittel-Additiv im Bereich von 1 - 98 Gew.-% liegt;
- 20 (vii) Zugabe von Hilfsstoffen zu einem oder mehreren der oben genannten Schritte a), b) und c), zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrote, Kleie, Getreidemehle, Mehle; Kieselsäuren, Silikate, Stärken und Zucker; oder

05.06.03

(viii) Überführung der nach c), i) bis vii) erhaltenen Stoffe in eine im Tiermagen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

Die erfindungsgemäßen, flüssigen Tierfuttermittel-Additive 5 können mindestens 2 Monate gelagert werden ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an Cystein-Verbindungen eintritt.

Die analytische Bestimmung der Cystein-Verbindungen und anderen Schwefel-haltigen, chemischen Verbindungen kann, 10 wie in der EP-A-0885962 beschrieben, durchgeführt werden. Danach erfolgt die Analyse des Gesamtcysteins nach der Methode von Gaitonde (Biochemical Journal 104, 627-633 (1967)), die freies und als Thiazolidin gebundenes Cystein 15 erfasst. In halbkonzentrierte Salzsäure aufgelöstes Cystin lässt sich unter reduzierenden Bedingungen (Dithiothreitol, DTT) ebenso bestimmen. Freie SH-Gruppen können mittels 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoësäure (DTNB) wie von Lee (Biochemical and Biophysical Research Communications 213, (3), 837-844 (1995)) erfasst werden.

20 Alternativ wird freies und aus der Gleichgewichtsreaktion der Thiazolidine freigesetztes Cystein durch Oxidation unter milden Bedingungen, beispielsweise mit Luftsauerstoff oder Wasserstoffperoxid (DE-A-3202295), in Cystin überführt, welches gemeinsam mit dem in der 25 Fermentationslösung ausgefallenen oder im Tierfuttermittel-Additiv vorliegenden Cystin einfach automatisiert nachweisbar ist. Eventuell zusätzlich entstandene Cysteinsäure ist erfassbar und mit zu berücksichtigen.

Bevorzugt wird freies und aus der Gleichgewichtsreaktion 30 der Thiazolidine freigesetztes Cystein wie auch ausgefallenes und/oder gelöstes Cystin gemäß dem Stand der Technik, wie er bei Varga-Visi et al. (Chromatographia 2000, 51 Suppl., 325-327) beschrieben ist, mittels

Perameisensäure zu Cysteinsäure oxidiert und mittels HPLC oder Aminosäureanalysator bestimmt.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse von L-Cystin

- 5 und/oder L-Cysteinsäure kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190-1206) beschrieben.

Patentansprüche

1. Tierfuttermittel-Additive auf Fermentationsbrühe-Basis, dadurch gekennzeichnet, dass sie
 - a) eine oder mehrere der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidine, einschließlich deren Salze, und
 - b) 2% - 100% der weiteren nicht-zellulären Inhaltsstoffe der Fermentationsbrühe enthalten.
2. Tierfuttermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Thiazolidinen um eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe 2-Methyl-thiazolidin-2,4-dicarbonsäure, 2-Carboxymethyl-thiazolidin-2,4-dicarbonsäure, 2-Carboxyethyl-thiazolidin-2,4-dicarbonsäure, und Thiazolidin-2,4-dicarbonsäure handelt.
3. Tierfuttermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Salzen der Cystein-Verbindungen um eines oder mehrere der Salze, ausgewählt aus der Gruppe der Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Magnesium- oder Calciumsalz handelt.
4. Futtermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie die während der Fermentation der Cystein-Verbindungen produzierenden Mikroorganismen gebildete Biomasse in einer Menge von >0% bis 100% enthalten.
5. Futtermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie in flüssiger Form vorliegen.

6. Futtermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie in fester Form vorliegen.
7. Tierfuttermittel-Additive gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie die während der Fermentation der Cystein-Verbindungen produzierenden Mikroorganismen gebildete Biomasse in einer Menge von >0% bis ≤50% im Tierfuttermitteladditiv enthalten.
8. Tierfuttermittel-Additive gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie die während der Fermentation der Cystein-Verbindungen produzierenden Mikroorganismen gebildete Biomasse in einer Menge von >50% bis 100% im Tierfuttermitteladditiv enthalten.
9. Tierfuttermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie Cystein-Verbindungen einschließlich ihrer Salze in einer Menge von 1 bis 98 Gew.-% enthalten.
10. Tierfuttermittel-Additive gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine oder mehrere der chemischen Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Glutathion, Cystathionin, Biotin, Thiamin, Liponsäure, Coenzym A und L-Methionin enthalten.
11. Verfahren zur Herstellung von Futtermittel-Additiven, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - 25 a) aus Cystein-Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen einschließlich deren Salze, enthaltenden Fermentationsbrühen die Biomasse vollständig (100%) abtrennt, und
 - b) gegebenenfalls das so erhaltene Gemisch durch Entfernen von Wasser aufkonzentriert.

12. Verfahren zur Herstellung von Futtermittel-Additiven, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) aus Cystein-Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen einschließlich deren Salze, enthaltenden Fermentationsbrühen die Biomasse nahezu vollständig oder zumindest den überwiegenden Teil ($\geq 50\%$ bis $< 100\%$) abtrennt, und
- b) gegebenenfalls das so erhaltene Gemisch durch Entfernen von Wasser aufkonzentriert.

10 13. Verfahren zur Herstellung von Futtermittel-Additiven, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) in Cystein-Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen einschließlich deren Salze, enthaltenden Fermentationsbrühen die Biomasse vollständig oder zum größten Teil (100% bis $> 50\%$) belässt, und
- b) gegebenenfalls das so erhaltene Gemisch durch Entfernen von Wasser aufkonzentriert.

20 14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 11, 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass man

- c) das Futtermittel-Additiv durch eine oder mehrere der Maßnahmen ausgewählt aus der Gruppe Trocknen, Sprührocknen, Sprühgranulieren und Granulieren herstellt.

25 15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 11, 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung der Cystein-Verbindungen haltigen Fermentationsbrühe L-Cystein produzierende Bakterien, Pilze oder Hefen in einem geeignetem Fermentationsmedium kultiviert.

16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 11, 12, 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zusätzlich noch einen oder mehrere der folgenden Schritte durchführt:

- 5 d) Elektrochemische Reduktion (Elektrolyse) des L-Cystins zu L-Cystein in einem oder mehreren der Schritte a) und b);
- 10 e) Ansäuerung mit einer konzentrierten Mineralsäure in einem oder mehreren der Schritte a) und b;
- 15 f) Zusatz eines Reduktionsmittels zu einem oder mehreren der Schritte a), b) und c);
- 20 g) Verwendung eines Schutzgases in einem oder mehreren der Schritte a), b) und c);
- 25 h) Zusatz eines Oxidationsmittels zu einem oder mehreren der Schritte a), b) und c);
- i) Zusatz von einer oder mehrerer der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidinen zu einem oder mehreren der Schritte a), b) und c), wobei die zugesetzte Menge an Cystein-Verbindung so bemessen ist, dass deren Gesamtkonzentration gegebenenfalls einschließlich ihrer Salze im Tierfuttermittel-Additiv im Bereich von 1 - 98 Gew.-% liegt;
- j) Zugabe von Hilfsstoffen zu einem oder mehreren der Schritte a), b) und c), zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrote, Kleie, Getreidemehle, Mehle; Kieselsäuren, Silikate, Stärken und Zucker; oder

- k) Überführung der nach c) bis j) erhaltenen Stoffe in eine im Tiermagen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Mineralsäure um Schwefelsäure handelt.
18. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Reduktionsmittel um eine oder mehrere der chemischen Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Vitamin C, Vitamin E, Ameisensäure und deren Salze handelt.
19. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Oxidationsmittel um eine oder mehrere der chemischen Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) handelt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Schutzgas um Stickstoff (N_2) handelt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Filmbildner um einen oder mehreren der Stoffe ausgewählt aus der Gruppe Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginat, Stearate, Stärken, Gummis oder Celluloseether handelt.
22. Tierfuttermittel-Additiv hergestellt gemäß den Ansprüchen 11 bis 21.
23. Tierfuttermittel-Additiv gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass es 1 Gew.-% bis 98 Gew.-% einer oder mehrerer der Cystein-Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe L-Cystein, L-Cystin und Thiazolidine gegebenenfalls einschließlich ihrer Salze enthält.

Zusamm nfassung

Die Erfindung betrifft Schwefel-haltige Tierfuttermitteladditive hergestellt aus Fermentationsbrühen.